

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05776

研究課題名(和文) イネの葉におけるストリゴラクトンを介した栄養欠乏応答機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of response to nutrient deficiency via strigolactone signaling in rice leaves

研究代表者

梅原 三貴久 (Umehara, Mikihiisa)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30469895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：dwarf3変異体の窒素代謝関連遺伝子の発現は、野生型や他のストリゴラクトン関連変異体よりも高かった。D3はストリゴラクトンだけでなく、カリキンスIGNALも制御することから、窒素代謝関連遺伝子の発現制御には、ストリゴラクトンよりもカリキンの影響が大きいと考えられる。また、窒素欠乏条件下でストリゴラクトンが増加し、葉の角度が小さくなるが、その角度の減少には硝酸イオンよりもアンモニウムイオンによる影響が大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネにおけるラミナジョイントの角度は、隣り合う葉の重なり具合に大きく影響するため、光合成の効率や収量にその影響が反映される。ストリゴラクトンのシグナルが欠損すると葉の角度が大きくなることから、隣り合う植物同士の葉が重なり、集団全体の光合成効率が低下し、収量が低下すると予想される。したがって、本研究の結果はストリゴラクトンの生合成量を調節することは、作物生産効率を向上させる上で大変重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：In d3 mutants, expression of nitrogen metabolism genes were up-regulated compared with the wild type and other strigolactone mutants. D3 regulates karrikin signal as well as strigolactone, so that karrikin signal might affect nitrogen metabolism rather than strigolactone signal. Lamina joint angle of wild type is smaller under nitrogen deficiency. In the nitrogen starvation, ammonium ion affects the lamina joint angle rather than nitrate ion.

研究分野：植物生理学

キーワード：ストリゴラクトン イネ 窒素欠乏 リン酸欠乏 硫黄欠乏 ラミナジョイント

1. 研究開始当初の背景

植物の枝分かれの数は、作物の収量に大きな影響を与える重要な農業形質である。枝分かれを制御する植物ホルモンとしてオーキシシンやサイトカイニンがよく知られているが、これに加えて申請者はストリゴラクトン (SL) が植物の枝分かれ抑制ホルモンとしての作用があることを発見した (Umehara et al. *Nature*, 2008)。無機栄養 (特に窒素やリン酸) が欠乏すると、根の内生 SL 量が増加することはいろいろな植物で確認されている (Yoneyama et al. *Planta*, 2007 他多数)。また、申請者らの研究で、窒素やリン酸だけではなく、硫黄欠乏条件下でも SL の産生量が増加することをイネで初めて明らかにした (Shindo, Umehara et al. *Plant Direct*, 2018)。SL は無機栄養 (特に窒素やリン酸) を宿主植物に供給する共生菌、アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) の菌糸分岐を活性化させる (Akiyama et al. *Nature*, 2005)。したがって、窒素やリン酸が欠乏して SL が増加すると、SL は余計な枝分かれを抑制するために働き、また根から分泌されて根圏の AM 菌との共生を促すシグナルとして働くと考えられる (Umehara et al. *Plant Cell Physiol.*, 2010)。また、リン酸欠乏環境下で植物を栽培すると、古い葉の栄養を回収するために葉の老化が早くなるが、この葉の老化の促進も SL が担っている (Yamada, Umehara et al. *Planta*, 2014)。イネの SL 関連突然変異体は分げつ数は増加しているにも関わらず、種子収量は野生型より少なく、種子サイズも約 30% 野生型より小さい (Yamada, Otake, Umehara et al. *J. Plant Growth Regul.*, 2019)。したがって、SL シグナルが欠損すると栄養の転流が上手く行われないのではないか、という仮説を提案できる。本研究では、イネの SL 関連突然変異体の葉で認められた以下の 2 つの現象に焦点を当てて研究を進めてきた。

まず一つ目は、SL 生合成および情報伝達欠損変異体 (SL 関連変異体) の葉では、いろいろなアミノ酸含量が著しく減少していることに注目した。キャピラリー電気泳動・質量分析計 (CE-MS) で一次代謝産物の一斉解析を行ったところ、SL の変異体 (*d* 変異体) における転流アミノ酸のグルタミン、アスパラギン含量が野生型よりも大きく減少していた (図 1)。そこで、イネの GS/GOGAT サイクルを中心とする窒素同化システムのうち、どのステップが SL シグナルの制御を受けるのかを明らかにすることを試みた。

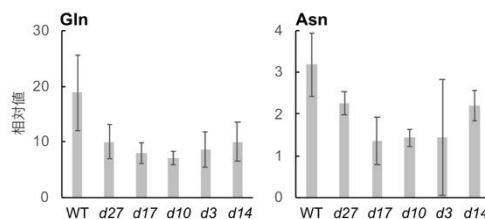


図 1 CE-MS 解析による転流アミノ酸量

二つ目は、SL 関連変異体におけるラミナジョイント (LJ) の屈曲角度が野生型に比べて大きいことである (Li et al. *J. Genet. Genomics*, 2014)。LJ とは、葉身および葉鞘という 2 つの葉の組織を連結するヒンジの役割をもつ部分である。SL 変異体では、LJ の向軸側の細胞数は減少しているが、個々の細胞の長さが長くなったために、野生型 (WT) より屈曲角度が大きい (図 2)。LJ に SL 合成アナログの GR24 を直接処理すると、WT と SL 生合成欠損変異体の *d27*、*d17*、*d10* の LJ の角度は小さくなった (図 2)。また、窒素やリン酸欠乏条件下では、LJ の角度が小さくなる (Ruan et al. *Plant Cell*, 2018, Kumagai et al. *Physiol. Plant.*, 2014)。そこで、根と同様、栄養欠乏条件下で内生 SL 量が増加して LJ の角度を制御しているどうかを検証した。

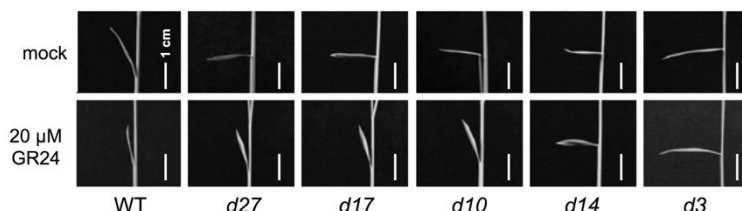


図 2 LJ の屈曲角度における GR24 の影響

2. 研究の目的

これまでの研究で、申請者はイネの SL 関連突然変異体を用いて、植物が SL シグナルを介してどのように窒素やリン酸欠乏環境に応答するのかを調べ、SL シグナルが欠損すると種子収量が減少することを明らかにした。SL は窒素あるいはリン酸欠乏条件下で増加することはよく知られているが、それがどのような意味を持つのかは未だ明確にはなっていない。植物はシンク器官に栄養を効率よく送り込む必要があるにも関わらず、SL シグナルが欠損すると枝分かれが増加し、葉の老化が遅延し、窒素代謝効率が低下することから、栄養の分配が上手くできないと予想される。そこで、葉における窒素代謝制御と栄養の転流における SL の役割を明らかにする。

一方、LJ の角度は、隣り合う植物の葉の重なり具合に影響し、光合成の効率、収量にその影響が反映される。SL シグナルが欠損すると葉の角度が大きくなることから、隣り合う植物同士の葉が重なり、集団全体の光合成効率が低下し、収量が低下すると予想される。本研究では、SL シグナルがどのように LJ の角度を制御しているのかを明らかにする。本研究では、栄養欠乏応答時の SL シグナルが葉身部の窒素代謝、ラミナジョイントの角度をどのように制御するのか、光合成効率や収量にどのように影響するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 窒素代謝における SL の機能解析

CE-MS で葉身の一次代謝産物の一斉解析を行ったところ、野生型に比べて SL 関連変異体では転流アミノ酸のグルタミン、アスパラギン含量が低下していた。そこで、リアルタイム PCR を用いて GS/GOGAT サイクルに関連する遺伝子発現解析を行う。葉身のグルタミン合成酵素、グルタミン酸合成酵素、アスパラギン合成酵素、アスパラギン分解酵素など (*GS1;1*, *GS2*, *NADH-GOGAT2*, *Fd-GOGAT*, *ASN2*, *Asnase* など) の遺伝子発現を解析し、野生型に比べて SL 関連変異体で発現量が変動しているものを特定する。また、これらの遺伝子発現がリン酸欠乏条件下でどのように変動するか、野生型と SL 関連変異体で比較した。

(2) LJ の屈曲角度における SL の影響

SL の内生量は、窒素、リン酸、硫黄などの栄養欠乏に応答して増加する。そこで、LJ の屈曲角度における SL の影響を明らかにするために、窒素、リン酸、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄欠乏条件下で栽培した時の LJ の角度をイメージ J で測定したところ、SL が増加する条件、窒素、リン酸、硫黄欠乏条件下で LJ の角度が小さかった (Shindo et al. *Front Plant Sci.*, 2020)。このことから、窒素、リン酸、硫黄欠乏条件下で内生 SL が増加し、LJ の角度をコントロールしている可能性がある。そこで、窒素、リン酸、硫黄が欠乏した時、LJ でどの SL 関連遺伝子の発現が変動しているのかをリアルタイム PCR で発現解析を行い、LC-MS/MS で内生 SL 量を定量し、それらの結果を野生型と SL 変異体とで比較した。さらに、イネの品種間で葉身屈曲応答に違いがあるかどうか検証した。特に、窒素欠乏に関しては SL 生合成欠損変異体を使用して $-NO_3^-$ と $-NH_4^+$ に対する影響について検証した。

4. 研究成果

栄養十分条件下で栽培した場合、*d3* 変異体の *GS1;1*, *GS2*, *NADH-GOGAT1*, *Fd-GOGAT*, *ASN1*, *ASN2*, *Asnase* の発現量が、野生型や他の変異体よりも高かった。リン酸欠乏で栽培した場合は、窒素代謝関連遺伝子の発現量に野生型と SL 関連変異体の間で差は認められなかった。リン酸欠乏条件下で栽培後にリン酸を施肥すると、*GS1;1* の発現量には大きな差は認められなかったが、*d3* と *d27* の *NADH-GOGAT2* の発現量は増加した。*D3* は F-Box タンパク質をコードしており、SL の情報伝達の他にカリキンの情報伝達にも関与している。カリキンは植物が燃焼することで生じ

た煙に含まれる植物成長調節物質であり、種子の発芽を刺激することが知られている。*d3*変異体でのみ窒素代謝関連遺伝子の発現が増加したことから、窒素代謝関連遺伝子の発現には、SLではなくむしろカリキシンシグナルの影響が大きいと考えられる。

また、葉の角度は重要な農業形質の一つで、葉を直立させることで光合成効率が向上し、密植栽培が可能になるため、単位面積当たりの穀物の収量増加に繋がる。したがって、葉の角度の制御機構について研究することは農業分野において重要である。植物ホルモンのストリゴラクトン(SL)はイネの葉身と葉鞘の接続部分であるラミナジョイント(LJ)の角度の増加を抑制する。イネの品種シオカリでは窒素(N)、リン(P)、硫黄(S)欠乏条件下で栽培するとSLの内生量が増加し、LJの角度が減少した。-N、-P、-S条件下でSL内生量が増加し、葉の角度が小さい状態のまま維持できると考えられる。ただ、シオカリのLJの角度は、他のイネ品種と比較して小さかった。このことから、イネの品種間で葉身屈曲応答に差がある可能性が示唆された。そこで、シオカリ、日本晴、農林8号、台中65号、カサラス、コシヒカリ、ひとめぼれ、キヌヒカリ、ササニシキ、あきたこまち、ヒノヒカリ、キヌムスメの12品種を使って、栄養欠乏条件下でのLJの角度の品種間差とSL量の関係について検証した。シオカリ、コシヒカリ、ヒトメボレでは、-N、-P、-Sで4-deoxyorobanchol(4DO)が増加し、LJの角度が減少した。日本晴、農林8号、キヌヒカリでは-N、-Pで根の内生量が増加し、LJの角度が減少した。シオカリ、コシヒカリ、ひとめぼれのLJの角度は-N、-P、-Sで減少した。ヒノヒカリ、キヌムスメ、あきたこまち、台中65号、カサラス、ササニシキのLJの角度は-Nでのみ減少した。また、カサラスとあきたこまちなSL定量分析の結果、いずれの欠乏条件下でも4DOの増加が認められなかった。以上の結果から、LJの角度の-N、-P、-Sに対する応答性は品種間で大きく異なると言える。

実験で使用した全品種で共通して-NでLJの角度が小さかったため、 NH_4^+ と NO_3^- のどちらがLJの角度に影響するかさらに調査を進めた。シオカリの場合、LJの角度はcontrolと $-\text{NO}_3^-$ では差は認められなかったが、 $-\text{NH}_4^+$ ではLJの角度が小さく、-Nとほぼ同等であった。また、シオカリのSL生合成欠損変異体*d10-1*および*d17-1*の場合、control、 $-\text{NO}_3^-$ 、 $-\text{NH}_4^+$ 、-N、いずれの条件下でもLJの角度に変化は認められなかった。日本晴の場合、controlと $-\text{NO}_3^-$ でほぼ同等で、 $-\text{NH}_4^+$ ではLJの角度がやや小さかったが、有意な差ではなかった。*d10-2*では、control、 $-\text{NO}_3^-$ 、 $-\text{NH}_4^+$ 、-N、いずれの条件下でもLJの角度に変化は認められなかった。したがって、-NでのLJの角度の減少は、 $-\text{NH}_4^+$ による影響が大きいと、品種間で窒素源の違いによる葉身屈曲応答が異なるものと考えられる。SL生合成遺伝子の発現を調べてみると、D27、D17、D10の発現が-Nで高く、+Nで低くなったが、*OsMAX1*の+/ -N間の発現変動は小さかった。そのため、-NにおけるSL生産量は-Pに比べて少ないのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shindo Masato, Nagasaka Seiji, Kashiwada Shosaku, Shimomura Koichiro, Umehara Mikihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Shoot has important roles in strigolactone production of rice roots under sulfur deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1880738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2021.1880738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shindo Masato, Umehara Mikihisa	4. 巻 1
2. 論文標題 Roles of Long-Distance Signals in Nitrogen, Phosphorus, and Sulfur Uptake and Sensing in Plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Hormones and Climate Change	6. 最初と最後の頁 273 ~ 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-19-4941-8_12	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梅原三貴久、境孝太郎、山本崇、進藤真登、下村講一郎
2. 発表標題 イネの葉身屈曲応答に関する品種間差とストリゴラクトン の影響
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Physiological roles of long-distance messengers in plants under nitrogen, phosphorus, and sulfur deficiency.
3. 学会等名 The 8th International Conference on Agricultural and Biological Sciences (ABS2022)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生命科学部 応用生物科学科 植物生長制御研究室 Umehara Lab.
http://www2.toyo.ac.jp/%7Eumehara/plant_biotechnology/Welcome.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	進藤 真登 (Shindo Masato)		
研究協力者	計良 小百合 (Kera Sayuri)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------